

• 论著-实验研究 •

胰岛素抵抗对大鼠慢性前列腺炎发病的影响
及 SIgA 表达李杰¹ 胡道荣¹ 徐世田¹

[摘要] 目的:研究大鼠胰岛素抵抗对慢性无菌性前列腺炎发病的影响,并初步探讨其机制。方法:实验分为两组:对照组(CON)、胰岛素抵抗组(IR)。CON 组喂基础饲料,IR 组喂高脂饲料诱导胰岛素抵抗,共喂养 10 周;糖耐量实验(glucose tolerance test, GTT)和胰岛素耐量实验(insulin tolerance test, ITT)检测大鼠胰岛素抵抗情况;大鼠处死后取前列腺液,通过镜检检测卵磷脂小体密度、红细胞和白细胞;qPCR 检测前列腺组织分泌型免疫球蛋白 A (Secretory immunoglobulin A, SIgA) 的表达水平,Western blot 检测前列腺组织 SIgA 的蛋白表达。结果:IR 组大鼠前列腺白细胞数明显高于 CON 组($P=0.0114$),卵磷脂小体密度低于 CON 组($P=0.0243$);IR 组前列腺组织 SIgA 基因和蛋白表达明显升高。结论:胰岛素抵抗能够明显升高大鼠的前列腺组织炎症反应,可能是慢性无菌性前列腺炎发病的一个高风险因素。

[关键词] 胰岛素抵抗;大鼠;慢性前列腺炎;SIgA

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2017.09.014

[中图分类号] R697 **[文献标识码]** A

Effects of insulin resistance on rat chronic prostatitis
and the expression of SIgA in prostate tissue

LI Jie HU Daorong XU Shitian

(Department of Urology, People's Hospital of Chongqing City Hechuan District, Chongqing, 401520, China)

Corresponding author: HU Daorong, E-mail: hudaorong@163.com

Abstract Objective: To investigate the effects of high-fat diet induced insulin resistance on rat chronic prostatitis (CP) and expression of SIgA. **Method:** The control (CON) group and insulin resistance (IR) group were established according to the experimental requirements. The IR group was established due to 10-week high-fat diet feed. Glucose and insulin tolerance tests (GTT and ITT) were performed. When two groups of rats were killed, the microscopy was performed to analyze lecithin density, erythrocyte count and leucocyte count. SIgA mRNA levels of prostate tissue were measured by qPCR. Western-blot analysis was used to determine the protein levels of SIgA. **Result:** Compared with CON group, IR group tended to be insulin resistance obviously. The IR group had higher level of white blood cell and lower level of lecithin bodies. Meanwhile, IR group had higher SIgA mRNA and protein levels. **Conclusion:** High-fat diet induced insulin resistance, which may be a high risk factors of CP in rat.

Key words insulin resistance; rat; chronic prostatitis; SIgA

慢性前列腺炎(chronic prostatitis, CP)是泌尿外科门诊男性最常见的疾病之一,其中 50 岁以下男性有着较高的患病率。泌尿外科门诊中约 30% 的男性就诊者为慢性前列腺炎,病情及病程因人而异,治疗效果往往不佳^[1,2]。慢性前列腺炎严重影响患者的生活质量,其发病与微生物感染、不良生活习惯、激素水平等有关,但发病机制、病理生理改变尚存在争议^[3~5]。近年来流行病学研究发现胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)可能是慢性前列腺炎的一个危险因素之一^[6]。但目前 IR 与慢性前

列腺炎的关系尚不明确,可能与 IR 导致的炎性因子分泌有关。因此本实验通过构建大鼠 IR 模型,观察胰岛素对雄性 SD 大鼠成年期 CP 发病情况的影响及潜在的可能机制,以利于 CP 的早期预防及干预进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SD 大鼠购自重庆医科大学实验动物中心,选用健康雄性 SD 大鼠 20 只(4 周龄左右)。饲养环境为无特定病原体(specific pathogen free, SPF)动物房。动物房温度为(25±2)℃,湿度为(55±5)%,照明时间为 12 h。平均 5 只大鼠关

¹重庆市合川区人民医院泌尿外科(重庆,401520)
通信作者:胡道荣, E-mail: hudaorong@163.com

一笼,塑料笼内垫料为辐照木屑。大鼠可以自由饮水和进食。

1.1.2 试剂 大鼠饲料购自美国 research diets 公司,基础饲料(产品编号 12450B):能量的 10%由脂肪提供,20%由蛋白质提供,70%由碳水化合物提供;高脂饲料(产品编号 12451):能量的 45%由脂肪提供,20%由蛋白质提供,35%由碳水化合物提供。Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;RNA 反转录试剂盒购自宝生物工程大连有限公司;SIgA 引物采用 Primer Express 3 设计,生工生物工程(上海)股份有限公司合成。兔抗鼠 SIgA 抗体购自美国 SANTA CRUZ 公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒(产品编号 P0010S)购自碧云天生物公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型 SD 大鼠分为 2 个组,CON 组(CON)10 只喂基础饲料,IR 组(IR)10 只喂高脂饲料,喂养 10 周后将进行糖耐量实验(glucose tolerance test, GTT)和胰岛素耐量实验(insulin tolerance test, ITT),共喂养 11 周后处死收集前列腺液,取前列腺组织冻存于-80℃冰箱待用。

1.2.2 糖耐量实验和胰岛素耐量实验 两组大鼠喂养 10 周后进行 GTT 和 ITT 实验。GTT 步骤为:实验前 1 天晚上开始禁食 16 h,保持饮水充足。每只实验大鼠按 2 g/kg 的剂量进行腹腔注射 40%的葡萄糖溶液,分别在注射第 0 min、15 min、30 min、60 min、120 min 尾尖取血涂擦血糖仪试纸,用血糖仪检测血糖值。ITT 步骤为:实验前禁食 4 h,并持饮水充足。每只大鼠按 1 unit/kg 的剂量腹腔注射胰岛素,分别在注射第 0 min、30 min、60 min、90 min、120 min 尾尖取血,用血糖仪检测血糖值。

1.2.3 前列腺液分析 大鼠处死后取前列腺组织挤出前列腺液,吸取 10 μl 在高倍镜下观察每个视野的白细胞数。另取 1 滴涂片镜检卵磷脂小体密度。并对其分级:满视野为 4 级,3/4 视野为 3 级,2/4 视野为 2 级,1/4 视野为 1 级^[7]。

1.2.4 Real time PCR 检测 mRNA 表达水平 大鼠处死后取前列腺组织。液氮处理研磨后用 Trizol 法提取细胞总 mRNA,反转录试剂盒转为 cDNA。用荧光定量 PCR 法检测分泌型免疫球蛋白 A(Secretory immunoglobulin A, SIgA)的 mRNA 表达水平。SIgA 上游序列为:5'-CCACTA-ACCGCCAACATC-3';下游序列为:5'-CGAAC-CAGCACATCCTTG-3'。采用荧光定量 PCR 分析软件 Bio-Rad CFX manager 分析结果。

1.2.5 蛋白表达检测 将两组大鼠前列腺组织液氮处理研磨后用裂解液提取总蛋白,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量,聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电泳结束后转膜至聚偏二氟乙烯膜。

5%脱脂奶粉封闭后,加入兔抗鼠 SIgA 一抗,4℃冰箱过夜,复温后用 TBST 洗膜,加入二抗孵育 1.5 h。采用凝胶成像仪采集图像,结果采用 Quantity One 软件进行条带灰度分析。

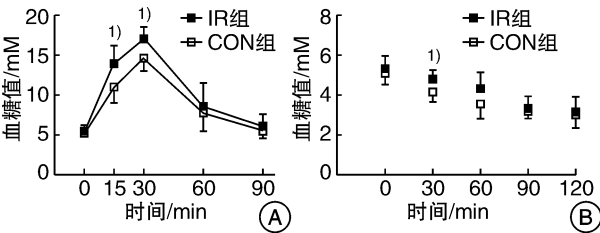
1.3 统计学方法

各组数据采用 Graphpad Prism 5 进行统计分析作图。各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IR 指标

CON 组和 IR 组喂养 10 周后监测糖耐量和胰岛素耐量,IR 组共有 7 只造模成功。如图 1 所示: GTT 实验中 IR 组在注射葡萄糖后 15 min 和 30 min 时血糖高于 CON 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 1A),表示出现糖耐量受损。ITT 实验中 IR 组在注射胰岛素后和 30 min 时血糖高于 CON 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 1B)。



A: GTT 实验; B: ITT 实验。与 CON 组比较, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 1 两组大鼠 IR 指标

2.2 前列腺液分析

如表 1 所示,与 CON 组比较,高倍镜下 IR 组前列腺液中白细胞数显著增多,卵磷脂小体密度显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组镜下均未发现红细胞和脓细胞。

表 1 两组大鼠前列腺液分析 $\bar{x} \pm s$

指标	CON 组(n=10)	IR 组(n=7)	P 值
白细胞(/HP)	2.14±0.50	2.98±0.80	0.0114
卵磷脂小体密度(分级)	3.60±0.16	2.90±0.23	0.0243
红细胞(/HP)	无	无	—
脓细胞(/HP)	无	无	—

2.3 两组大鼠前列腺 SIgA 的 mRNA 表达水平

如图 2 所示,与 CON 组比较,IR 组前列腺组织 SIgA 的 mRNA 表达明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 两组大鼠前列腺 SIgA 蛋白表达水平

Western blot 结果见图 3。与 CON 组比较,

IR 组前列腺组织 SIgA 的蛋白表达明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

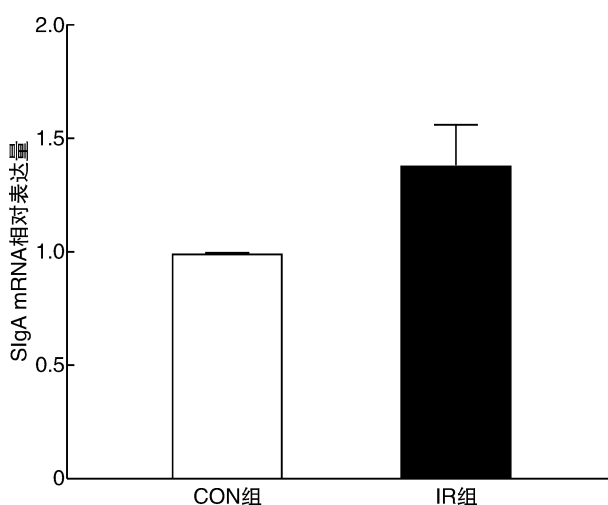


图 2 两组大鼠前列腺 SIgA 的 mRNA 表达水平

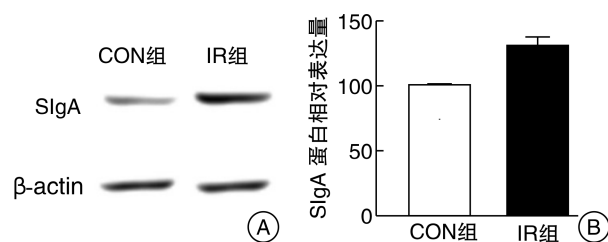


图 3 两组大鼠前列腺 SIgA 蛋白表达水平

3 讨论

CP 是一种男性泌尿外科门诊十分常见的疾病, 一般患者有尿频、尿急、尿痛、排尿不尽等症状, 患者常诉会阴和下腹部等有不适或疼痛感。其发病机制和病理基础尚存在争议。近来有研究发现, 除了感染因素、年龄、不良生活方式和雄激素因素外, 高胰岛素血症、代谢紊乱可能是 CP 的危险因素^[6,7]。国内学者研究发现肥胖会导致前列腺局部炎症因子分泌增加, 前列腺液中炎症因子 IL-6 和 IL-8 的分泌表达都明显高于正常组^[8,9]。国外研究发现代谢综合征患者的前列腺体积增长速度比正常人快, 其机制可能与 IR 和高胰岛素血症有关^[10]。

研究表明前列腺是一种免疫源性器官, 如果受到外源性致病因子刺激, 就会有相关细胞因子与炎症反应^[11,12]。众所周知 IR 和继发的高胰岛素血症是代谢综合征 (metabolic syndrome, MS) 的核心特征^[13~15], 也被认为是 MS 和 CP 风险因素增加之间重要的联系。在本文的研究中, 高脂饲料诱发的 IR 大鼠其前列腺液中卵磷脂小体密度和白细胞数量分别低于和高于正常组, 差异具有统计学意义

($P < 0.05$), 提示 IR 与慢性前列腺液的发病具有一定的联系。

国内外研究证明 IR 和 MS 患者的血液中的炎症标志物 IL-6、TNF- α 等都明显高于普通人群^[16]。本研究重点探讨了 SIgA 的表达。SIgA 是 60 年代初 Chodirker 等学者在胃肠液、乳汁、前列腺液和呼吸道分泌液等外分泌液中发现的一种 IgA 抗体, 是消化系统、泌尿生殖系统和呼吸系统等组织抵御病原微生物及有害物质的第一道免疫屏障, 是人体黏膜免疫的最重要抗体之一^[17]。SIgA 通常在体液中以多聚体存在, 有较强的抗原结合力。当有病原微生物或有害刺激因素等致病因子作用前列腺时, 前列腺组织发生炎症反应, 同时机体的局部防御系统也会作出相应反应。前列腺局部防御系统表现之一是各种细胞因子的变化, 如 SIgA、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 和凋亡抑制蛋白 (inhibitor-of-apoptosis protein, IAP) 等, 同时也有前列腺组织上皮细胞表面细胞因子受体变化, 如白介素 2 受体 (interleukin-2 receptor, IL-2R) 等, 各种细胞因子相互作用并组成复杂的反馈网络, 影响 CP 的发生发展和预后。研究发现, SIgA 不活化补体, 直接阻止病原体 and 有害因子黏附于上皮细胞, 达到局部抗炎效果。在本研究中, IR 组的 SIgA 基因和蛋白表达明显高于 CON 组, 说明 IR 促进了前列腺组织炎症反应的发生和发展。

IR 促进前列腺局部发生炎症反应可能与下列机制有关^[6]: ①发生 IR 时, 机体产生代偿性的高胰岛素血症, 刺激下丘脑腹内侧核, 增加交感神经的活性, 导致血液儿茶酚胺 (catecholamine, CA) 的浓度升高。CA 可通过缓慢地降低前列腺细胞凋亡而对促进其生长作用, 并导致前列腺增生和炎症反应。②高胰岛素血症可促进性激素水平升高, 增加 CP 风险。③胰岛素受体与胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 受体同源, 胰岛素与 IGF 受体结合可促进前列腺细胞有丝分裂, 刺激前列腺生长。

综上所述, IR 介导的慢性炎症反应在慢性前列腺炎的发生发展中可能起了重要作用, 可能是男性发生慢性前列腺炎的一个高风险因素。所以努力改善自身代谢状况、加强健康监测、控制肥胖和代谢紊乱, 对于预防慢性无菌性前列腺炎的发生发展具有重要的意义。

【参考文献】

- 桂士良, 王莱琳, 罗振国, 等. 慢性前列腺炎患者精浆中细胞因子的表达水平及临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(10): 2770—2771.
- 朱勇, 孙红君, 刘正建, 等. 难治性慢性前列腺炎的治疗进展[J]. 中国男科学杂志, 2016, 30(5): 70—72.

- 3 Papeš D, Pasini M, Jerončić A, et al. Detection of sexually transmitted pathogens in patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain: a prospective clinical study[J]. Int J STD AIDS, 2017, 28(6): 613–615.
- 4 Maury E, Brichard S M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 314(1): 1–16.
- 5 Tewari R, Rajender S, Natu S M, et al. Diet, obesity, and prostate health: are we missing the link[J]. J Androl, 2012, 33(5): 763–776.
- 6 王伟, 何家扬, 施国伟, 等. 胰岛素抵抗对良性前列腺增生患者前列腺生长影响的初步研究[J]. 现代泌尿外科杂志, 2010, 15(6): 425–428.
- 7 杨浚, 王绪国, 梅平. 慢性前列腺炎患者治疗前后血清超氧化物歧化酶、胰岛素样生长因子-II 和白细胞介素-6 水平检测的临床意义[J]. 中国实用医刊, 2010, 37(16): 48–49.
- 8 刘世学, 李可, 谢斌, 等. 肥胖对大鼠前列腺炎症反应的影响及其相关机制[J]. 重庆医学, 2014, 43(4): 469–473.
- 9 刘世学, 李可, 谢斌, 等. 肥胖对大鼠前列腺炎症反应的影响及其相关机制[J]. 重庆医学, 2014, 43(4): 469–473.
- 10 马莉, 曹薇. 平车前提取物对慢性非细菌性前列腺炎大鼠炎症因子的影响[J]. 医药导报, 2016, 35(6): 592–596.
- 11 高卫军, 王长海. 良性前列腺增生合并慢性前列腺炎的研究进展[J]. 西北国防医学杂志, 2012, 33(4): 453–455.
- 12 叶海云, 侯树坤, 白文俊, 等. 慢性前列腺炎患者前列腺液 IL-6 和 IL-8 表达变化及意义[J]. 中华泌尿外科杂志, 2003, 24(4): 279–281.
- 13 Altuntaş Y, Batman A. Microbiota and metabolic syndrome[J]. Turk Kardiyol Dern Ars, 2017, 45(3): 286–296.
- 14 Mozumdar A, Liguori G. Persistent increase of prevalence of metabolic syndrome among U. S. adults: NHANES III to NHANES 1999–2006[J]. Diabetes Care, 2011, 34(1): 216–219.
- 15 Lim S, Shin H, Song J H, et al. Increasing prevalence of metabolic syndrome in Korea: the Korean National Health and Nutrition Examination Survey for 1998–2007[J]. Diabetes Care, 2011, 34(6): 1323–1328.
- 16 孙波, 李辉, 王宁. 肥胖与慢性炎症[J]. 生物学杂志, 2012, 29(2): 88–90.
- 17 高卫军, 王养民, 王长海, 等. 良性前列腺增生合并慢性前列腺炎组织中 SIgA、 $\alpha 1$ -AR 的表达与意义[J]. 中华男科学杂志, 2013, 19(4): 315–320.

(收稿日期: 2017-02-07)

欢迎订阅 2018 年《临床泌尿外科杂志》

(邮发代号 38-124)

《临床泌尿外科杂志》(刊号: ISSN 1001-1420, CN 42-1131/R)是中华人民共和国教育部主管, 华中科技大学同济医学院附属协和医院和同济医院联合主办的泌尿外科学专业学术期刊, 1986 年 7 月创刊, 至今已三十余年, 属于老牌名刊, 深受国内临床泌尿外科医生的欢迎。主要刊登泌尿外科学及男科学的相关科技学术论文, 辟有专家论坛、临床研究、实验研究、流行病学调查、综述、研究报告、病例报告、国外医学新进展等栏目。现为大 16 开本(208 mm×295 mm), 基础页码为 80 页。封面为 157 g 铜版纸四彩封塑, 内芯为 105 g 铜版纸彩图精印。2018 年每期订价为 16.00 元, 半年价 96.00 元, 全年价 192.00 元。欢迎全国泌尿外科医生及相关研究人员到当地邮局订阅, 邮发代号 38-124, 也可登录中国邮政报刊订阅网 <http://bk.11185.cn> 或直接在编辑部订阅(电话: 027-85726342-8818)。

订阅《临床泌尿外科杂志》可以在第一时间掌握国内泌尿外科学的最新研究动态, 了解最新专业信息。欢迎全国泌尿外科医生及相关人员订阅!

《临床泌尿外科杂志》编辑部